



Modificaciones estructurales y ultraestructurales en la mucosa gastrointestinal por acción de radicales libres. Posible efecto protector del etanol

Falcón Romero M¹, Gómez Zapata M¹, Vicente Ortega V², Martínez Díaz FJ³, Ordóñez Escudero D¹, Luna Maldonado A¹

¹ Cátedra de Medicina Legal y Forense. Facultad de Medicina, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia. Teléfono: 968 36 39 56/57. e-mail: falcon@fcu.um.es

² Cátedra de Anatomía Patológica. Universidad de Murcia.

³ Cátedra de Toxicología. Universidad de León.

Recibido 29 de Enero de 2001 / Aceptado 27 de Febrero de 2001

Resumen: El objetivo de este trabajo es estudiar cómo se modifica la estructura de la mucosa gastrointestinal al verse expuesta a radicales libres y determinar si el etanol puede disminuir los daños producidos por estos radicales libres.

Para ello hemos estudiado las alteraciones histológicas (estructurales y ultraestructurales) de la mucosa gastroduodenal de ratas tratadas con el reactivo de Fenton (generador de radicales libres) con y sin etanol.

Nuestros resultados muestran que a nivel estructural, el grupo de ratas a las que se administró etanol junto con el reactivo de Fenton presentaban menos lesiones de tipo inflamatorio que el grupo de animales tratados solo con el reactivo de Fenton sin etanol, lo que indica que el etanol si amortigua la acción de estos radicales libres. Sin embargo a nivel ultraestructural no podemos hacer diferenciaciones entre los dos grupos ya que todas las lesiones encontradas son lesiones celulares inespecíficas y aparecen con igual frecuencia en los mismos.

Por lo tanto, debido a la inespecificidad de las alteraciones histológicas producidas por los radicales libres, estas solo nos pueden reflejar la intensidad del daño producido pero no su etiología.

Palabras clave: Mucosa gastrointestinal, radicales libres y etanol.

Abstract: *Structural and ultrastructural modifications in gastrointestinal mucosa mediated by free radicals. Possible protective effect by ethanol.* The aim of this work was to study the histological modifications of the gastrointestinal mucosa when exposed to free radicals and to ascertain whether ethanol can reduce the damage caused by these free radicals. For this, we studied structural and ultrastructural modifications of the gastrointestinal mucosa of rats treated with Fenton reagent (a free radical producer) with or without added ethanol.

At the structural level, the results pointed to more inflammatory lesions in the rats treated with Fenton reagent alone.

At the ultrastructural level, on the other hand, no differences were observed between the kind of cellular lesions found in rats treated with Fenton reagent and those found in rats treated with

both Fenton reagent and ethanol, since all the lesions were unspecific and appeared with the same frequency.

Due to the lack of specificity in the histological alterations produced by free radicals, such alterations can only reflect the intensity but not the etiology of the damage produced.

Key words: Gastrointestinal mucosa, free radicals and ethanol.

Introducción

Las patologías debidas a la acción local de los radicales libres sobre la mucosa gastrointestinal, como son diarreas, dispepsias, cuadros de mala absorción etc. son muy frecuentes en la población general [1-3]. Esto puede ser atribuido, entre otras muchas causas, a la administración oral de complejos vitamínicos y antianémicos, que son capaces de generar radicales libres mediante la reacción de Fenton (sales ferrosas más ácido ascórbico) [4].

La mucosa gastrointestinal por sus características es muy vulnerable a la acción de los radicales libres, con lo que además del efecto bioquímico pueden observarse alteraciones histopatológicas que reflejan la intensidad del daño provocado por estos.

En nuestro medio existe una alta prevalencia del consumo de alcohol y de este tipo de preparados con sales ferrosas [5-6], y aunque el etanol también produce lesiones gástricas mediadas por radicales libres [8-10] existen referencias que demuestran el papel protector del etanol en la génesis de radicales libres "in vitro" [7]. Así nuestro objetivo será establecer la influencia del etanol en las alteraciones estructurales y ultraestructurales que los radicales libres generan en la mucosa gástrica y duodenal de ratas tras la administración del reactivo de Fenton, mediante el correspondiente estudio anatomopatológico de las lesiones que aparecen en dichas mucosas.

Material y Métodos

Se establecieron 4 series experimentales de 20 ratas Sprague-Dawley cada una, diez machos y diez hembras, con un peso entre 220-260 gramos, alimentadas con la dieta UAR A.04 de Panlab (25 g aproximadamente) y agua a voluntad

Serie A. Ratas que corresponden al grupo control, sólo ingieren una alimentación normal de mantenimiento

Serie B. Ratas con alimentación normal a las que se les administra 100 mg de sulfato amónico-ferroso, 100 mg/día de ácido ascórbico, en una solución de 0.5 ml. de suero salino mas 0.33 ml de etanol con 0.17 ml de suero salino.

Serie C. Ratas con alimentación normal a las que se les administra 0.33 ml de etanol con 0.17 ml de suero salino.

Serie D. Ratas con alimentación normal a las que se les administra 100 mg de sulfato amónico-ferroso, 100 mg/día de ácido ascórbico, en una solución de 0.5 ml. de suero salino.

La administración de las distintas soluciones se realizó durante 30 días mediante sonda gástrica utilizando sondas nasogástricas pediátricas (Ch 8/50) acortadas con un espacio muerto de 0.4 ml. Posteriormente se realizó el sacrificio de cada rata con éter etílico y se realizó la toma de las muestras de la pared gástrica y duodenal para el estudio de microscopía óptica y electrónica. El estudio estadístico se ha realizado con el test de Chi cuadrado utilizando el paquete estadístico SPSS.

Para el estudio estructural los fragmentos de pared gástrica y duodenal se fijaron en formalina tamponada al 10%. Se realizaron cortes que comprendían todo el espesor de la pared y se incluyeron en parafina siguiendo el método habitual. Con un microtomo se obtuvieron cortes finos de 4 micras que se montaron en un portaobjetos previamente gelatinizado. Los cortes fueron teñidos mediante las Técnicas de Hematoxilina-Eosina y Azul Alcian (pH 2.5)-PAS y estudiados con un fotomicroscopio Leitz Orthoplan FSA.

Para el estudio ultraestructural las muestras de un milímetro cúbico fueron fijadas en glutaraldehído al 2% con tampón cacodilato, posteriormente fijadas con tetróxido de osmio al 1% y teñidas con acetato de uranio al 1.5%. Tras deshidratación con alcoholes a concentraciones crecientes, se impregnaron en Epon, realizando cortes semifinos que fueron teñidos con azul de toluidina. Seleccionadas las zonas más idóneas, se realizaron cortes ultrafinos, que fueron contrastados con acetato de uranio y citrato de plomo y estudiados con un microscopio electrónico Zeiss EM 10C, con una aceleración de 60 Kv.

Resultados del estudio estructural

En los resultados del estudio estructural de estómago y duodeno se observan distintos tipos de alteraciones histológicas:

- Edema submucoso: separación de estructuras submucosas por un material claro, eosinófilo, proteináceo y granular.
- Papilomatosis: formación de papilas en el estómago anterior con alargamiento de crestas interpapilares que alcanza aproximadamente el 50% de la mucosa.
- Inflamación crónica inespecífica (ICI): infiltración de mucosa y/o submucosa por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
- Duodenitis crónica: infiltración de la mucosa de intestino delgado por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

- Depleción mucosa: ausencia de secreción mucinosa que se limita a escasas vesículas citoplásmicas.

En la serie A (control) todas las preparaciones aparecen sin alteraciones relevantes excepto una en la que observamos papilomatosis.

La serie C nos muestra el tipo de lesiones que produce el etanol cuando se administra solo. Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del estudio estructural de la serie C

| | Serie C (etanol) |
|-------------------------|------------------|
| SAR* | 10 |
| Papilomatosis | 3 |
| Edema | 4 |
| ICI** | 1 |
| Depleción mucosecretora | 2 |

* Sin alteraciones relevantes.

** Inflamación crónica inespecífica

El tipo de lesiones de las series B y D correspondientes a los grupos tratados con el reactivo de Fenton con y sin etanol se muestra en la tabla 2.

Los datos estadísticos nos permiten establecer diferencias estadísticamente significativas en el número de ratas sin ningún tipo de lesión que aparecen con mayor frecuencia en el grupo de animales tratados con el Reactivo de Fenton más etanol.

Si nos fijamos en las lesiones más severas, que implican inflamación con presencia de infiltrado celular tanto de respuesta aguda como crónica, y agrupamos las lesiones del tipo ICI, papilomatosis y duodenitis en una sola categoría vemos que existe una clara diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Tabla 3.

Resultados del estudio ultraestructural

En la serie A no se encuentra ninguna alteración de la ultraestructura de la mucosa gástrica ni duodenal.

En el resto de los casos estudiados encontramos de forma generalizada:

1. Fenómenos de tumefacción de organelas, caracterizadas por dilatación de las cisternas del complejo de Golgi, con vesiculación de las mismas, así como de los sáculos del retículo endoplásmico liso y rugoso y de las mitocondrias.
2. Era constante la observación en los citoplasmas, de vesículas múltiples de contenido electronolúcido junto con la alteración de las microvellosidades de las células superficiales, con áreas de ensanchamiento e incluso distorsión de dichas microvellosidades y vesiculación subsiguiente.
3. También se observó en todos los grupos ensanchamiento de las uniones intercelulares.

En ninguno de los casos hemos encontrado lesiones consideradas como irreversibles y por tanto precursoras de

Tabla 2. Resultados del estudio estructural de los grupos tratados con el reactivo de Fenton con y sin etanol. Datos estadísticos

| alteraciones | Reactivo de Fenton + etanol n = 20 | | Reactivo de Fenton n = 20 | | Chi-cuadrado (test exacto de Fisher) | | | Cramer | | |
|------------------|------------------------------------|-----|---------------------------|-----|--------------------------------------|----|-------|--------|----|-------|
| | Nº muestras positivas | % | Nº muestras positivas | % | X2 | sl | sig | rv | sl | sig |
| Sin alteraciones | 6 | 30% | 1 | 5% | 4.33 | 1 | 0.037 | 4.72 | 1 | 0.03 |
| Papilomatosis | 0 | 0 | 3 | 15% | 3.243 | 1 | 0.072 | 4.402 | 1 | 0.036 |
| Atrofia* | 4 | 20% | 0 | 0 | 4.44 | 1 | 0.035 | 5.99 | 1 | 0.14 |
| Edema | 8 | 40% | 7 | 35% | 0.107 | 1 | 0.744 | 0.107 | 1 | 0.744 |
| ICI | 2 | 10% | 7 | 35% | 3.584 | 1 | 0.058 | 3.752 | 1 | 0.053 |
| Duodenitis | 0 | 0 | 2 | 10% | 2.105 | 1 | 0.147 | 2.878 | 1 | 0.09 |

* Las atrofas corresponden con dos casos de atrofia localizados en la mucosa antral y dos en el fundus gástrico y a nuestro juicio son artefactos de tipo mecánico generados durante el sondaje

Tabla 3. Resultados estadísticos al agrupar las lesiones de tipo inflamatoria en una sola categoría

| Papilomatosis + ICI + Duodenitis | Reactivo de Fenton + etanol n = 20 | | Reactivo de Fenton n = 20 | | Chi-cuadrado (test exacto de Fisher) | | | Cramer | | |
|----------------------------------|------------------------------------|-----|---------------------------|-----|--------------------------------------|----|-------|--------|----|-------|
| | Nº muestras positivas | % | Nº muestras positivas | % | X2 | sl | sig | rv | sl | sig |
| | 2 | 10% | 12 | 60% | 10.989 | 1 | 0.001 | 11.872 | 1 | 0.001 |

muerte celular, tales como fragmentación del sistema de membranas, calcificación de la matriz mitocondrial, etc. En resumen, las alteraciones observadas correspondían a lesiones celulares reversibles en todos los casos, destacando las típicas de edema intercelular e intracelular (ensanchamiento de los complejos de unión). No encontramos diferencias relevantes entre los distintos grupos de tratamiento, aunque sí entre estos respecto a la serie A.

Discusión

La expresión estructural del daño provocado por la acción de los radicales libres muestra un patrón inespecífico de respuesta que no permite inferir el origen del mismo. Nuestros resultados confirman la hipótesis inicial: el etanol actúa disminuyendo las alteraciones estructurales que los radicales libres generados por las sales ferrosas provocan sobre la mucosa gástrica. Así, al comparar los grupos tratados con reactivo de Fenton, con y sin etanol, observamos como en el grupo con etanol existe una menor proporción de lesiones con infiltrado inflamatorio, y aunque la proporción de edema es igual en ambos grupos, podemos asumir que el alcohol realiza una acción de amortiguación de las lesiones generadas por los radicales libres. Esto puede explicarse por la acción directa del etanol que actúa de forma local captando radicales OH, para formar el radical hidroxietilo, mucho menos reactivo. Siendo estos resultados compatibles con los obtenidos *in vitro* [7]. El etanol por sí mismo también produce lesiones gástricas mediadas por radicales libres [8-10]. A nivel ultraestructural las lesiones descritas expresan una acción irritativa inespecífica perfectamente compatible con la acción de los radicales libres, y tanto por su naturaleza como por su localización tienen un carácter reversible.

El estudio ultraestructural muestra unos resultados inespecíficos que no nos permite establecer una conclusión positiva clara; el mecanismo de acción de los radicales libres a lo largo del tratamiento queda expresado o en lesiones ya estructuradas que presentan respuesta inflamatoria o en lesiones inespecíficas de corta evolución. No hemos encontrado referencias bibliográficas que nos permitan contrastar los resultados de nuestro diseño experimental con otros similares.

El consumo de alcohol no puede a nuestro juicio proponerse como una alternativa terapéutica preventiva a la acción de los radicales libres generados en el tracto digestivo. Es más razonable el evitar la preparación de fármacos o la ingestión simultánea de sustancias capaces de generar en la mucosa gastrointestinal radicales libres.

Bibliografía

- Halliwell B, Gutteridge JMC (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14.
- Halliwell B (1987) Free radicals and metals: ions health and disease. *Proc. Nutr. Soc* 46: 13-26.
- Slivka A, Kang J, Cohen G (1986) Hydroxyl radicals and the toxicity of oral iron. *Biochem Pharmacol* 35: 553-556.
- Samuni A, Aronovitch J, Gerdinger D, Chavion M, Czapski G (1983) On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. *Eur. J. Biochem* 137: 119-124.
- Cederbaum AI (1989) Oxygen radicals generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *J. Free. Radic. Biol. Med* 7: 559-567.
- Nordmann R, Ribiere C, Ponach H (1987) Involvement of iron and iron-catalyzed free radical. Production in ethanol metabolism and toxicity. *Enzyme* 37: 57-69.
- Carrón Alcaraz C, Roldán Ortega R, Gómez Zapata M, Sánchez García JA, Luna Maldonado A (1991) Cinética de formación de radicales libres en jugo gástrico humano. *Rev. Toxicol* 8: 379-387.
- Mizui T, Sato H, Hirose F, Doteuchi M (1987) Effect of antiperoxidative drugs on gastric damage induced by ethanol in rats. *Life. Sci* 41:755-763.
- Szelenyi I, Brune K (1988) Possible role of oxygen free radicals in ethanol induced gastric mucosal damage in rats. *Dig. Dis Sci* 33: 865-871.
- Puurunen J, Laitinen L A (1982) Gastric mucosal oxidation of ethanol is not involved in ethanol-induced mucosal damage. *Toxicol Lett* 14: 195-200.